

BUNDE REPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D 01 SEP 2003

WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

BEST AVAILABLE COPY

Aktenzeichen: 102 32 151.5

Anmeldetag: 16. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin,
Berlin/DE

Bezeichnung: Neuronal exprimierte Tryptophanhydroxylase
und ihre Verwendung

IPC: C 12 N, C 12 Q, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 6. August 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Merkenz

Klostermeyer

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Anmelder: MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN

Erfinder: Dr. D. Walther, Dr. M. Bader

NEURONAL EXPRIMIERTE TRYPTOPHANHYDROXYLASE UND IHRE VERWENDUNG

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft neue spezifisch neuronale exprimierte Proteine mit Tryptophanhydroxylaseaktivität, Nukleinsäuresequenzen, rekombinante Nukleinsäuremoleküle, enthaltend die Nukleinsäuresequenzen oder Vektoren, enthaltend die Nukleinsäuresequenzen oder die rekombianten Nukleinsäuremoleküle, die für eine neuronale Tryptophanhydroxylase kodieren.

Die Erfindung betrifft außerdem transgene Organismen enthaltend die Nukleinsäuresequenzen, die rekombinanten Nukleinsäuremoleküle oder die oben genannten Vektoren sowie mono- oder polyklonale Antikörper, die gegen die isolierten Proteine gerichtet sind.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäuresequenzen und Proteine zur Diagnose, Prädisposition, Therapie und Monitoring von neuronalen Erkrankungen.

Mögliche Anwendungsgebiete der Erfindung sind unter anderem die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

BESCHREIBUNG**STAND DER TECHNIK**

Serotonin ist nicht nur ein Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (CNS), sondern auch ein überall in der Peripherie zu findendes Hormon, das in die Vasokonstriktion und Thrombozytenfunktion einbezogen ist. Tryptophanhydroxylase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Serotoninbiosynthese. Serotonin (5-hydroxytryptamin, 5-HT) ist ein monoaminergener Neurotransmitter, der an mehrfachen Aspekten der Stimmungssteuerung und der Regulierung des Schlafs, der Angst, des Alkoholismus, des Drogenmissbrauchs, der Nahrungsaufnahme und des sexuellen Verhaltens (J. Veenstra-VanderWeele, G. M. Anderson, E. H. Cook Jr., *Eur. J. Pharmacol.* 410, 165 (2000)) mit Tryptophanhydroxylase (TPH; EC 1.14.16.4) als geschwindigkeitsbegrenzendes Enzym der ersten Stufe bei seiner Biosynthese beteiligt ist (P. F. Fitzpatrick, *Annu. Rev. Biochem.* 68, 355 (1999)). Das TPH-Enzym gehört zur Superfamilie der aromatischen Aminosäurehydroxylasen (P. F. Fitzpatrick, *Annu. Rev. Biochem.* 68, 355 (1999)), zusammen mit Phenylalanin- (PAH) und Tyrosinhydroxylasen (TH).

Das serotonergene Projektionssystem ist das umfangreichste monoaminergene System im Hirn der Wirbeltiere, ist jedoch auch am schwierigsten zu untersuchen. Die Wurzeln dieses Systems sind auf wenige selektiv 5-HT synthetisch erzeugende Neuronen im Mittelhirn, Pons und der Medulla oblongata, die insgesamt die verschiedenen Gruppen der Nuclei Raphe B1-B9 darstellen, beschränkt (A. Dahlström, K. Fuxe, *Acta Physiol. Scand.* 62: Suppl. 232, 1 (1964)). Des weiteren stellt 5-HT ein Zwischenprodukt in der Biosynthese des Hormons Melatonin dar und daher exprimiert die Epiphyse bei einer 24-Stundensteuerung mit ma-

ximaler Aktivität in der dunklen Periode (J. M. Miguez, F. J. Martin, M. Aldegunde, *Neurochem. Res.* 22, 87 (1997)) die höchsten Mengen an TPH.

Außer im Hirn und in der Epiphyse wurde TPH in enterischen Neuronen (E. Fiorica-Howells, L. Maroteaux, M. D. Gershon, *J. Neurosci.* 20, 294 (2000)), präimplantierten Embryonen (D. J. Walther, M. Bader, *Mol. Brain Res.* 68, 55 (1999)), Mastzellen (L. M. Finocchiaro et al. *J. Interferon Res.* 8, 705 (1988)) und am auffallendsten in Enterochromaffinzellen des Magen- und Darmtraktes entdeckt (L. J. Weber, A. Horita, *Biochem. Pharmacol.* 14, 1141 (1965)). Von diesen Zellen wird angenommen, dass sie die Quelle von 5-HT im Blut sind, wo es fast ausschließlich in dichten Lagervesikeln der Thrombozyten (J. Champier et al. *Life Sci.* 60, 2191 (1997)) eingelagert ist. 5-HT ist in verschiedene Prozesse im peripheren Gewebe einbezogen, wie Regulierung des vaskulären Tonus (M. M. Rapport, A. A. Green, I. H. Page, *J. Biol. Chem.* 176, 1237 (1948)), der Darmmotilität (M. D. Gershon, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13, 15 (1999)), der primären Hämostase (J. M. Holland, *Proc. Exp. Biol. Med.* 151, 32 (1976)) und der zellvermittelten Immunreaktionen (G. P. Geba et al. *J. Immunol.* 157, 557 (1996)). Da die 5-HT-Mengen im Hirn und der Peripherie mit der TPH-Aktivität direkt verbunden sind, ist das Verständnis der TPH-Expression und Regulation ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der Funktionen von 5-HT im ZNS und im peripheren Gewebe.

MÄNGEL DES STANDS DER TECHNIK

Vom Vorhandensein von TPH mRNA und Protein im ZNS von Wirbeltieren wurde mehr als zehn Jahre berichtet, die Daten waren jedoch unvereinbar. In der Epiphyse und den Nuclei Raphe (S. Dumas, M. C. Darmon, J. Delort, J. Mallet, *J. Neurosci. Res.*

24, 537 (1989), R. P. Hart, R. Yang, L. A. Riley, T. L. Green, *Mol. Cell. Neurosci.* 2, 71 (1991)) wurden z. B. verschiedene mRNA- zu Proteinmengen entdeckt: vergleichbare TPH-Proteinmengen sind in Nuclei Raphe und in der Epiphyse vorhanden, während die mRNA-Mengen zumindest 1000 Mal höher in letzterer sind (F. Chamas, L. Serova, E. L. Sabban, *Neurosci. Lett.* 267, 157 (1999)). Diese Unterschiede in den Protein-mRNA-Verhältnissen wurden in allen Studien den verschiedenen Translationsleistungen von mRNAs, die in der 5'-nichttranslatierten Region unterschiedlich gespleißt wurden, zugeschrieben.

Es gibt jedoch seit mehr als dreißig Jahren Nachweise der Existenz verschiedener TPH-Isoformen (C. D. Cash, *Gen. Pharmac.* 30, 569 (1998), 21. S. M. Mockus, K. E. Vrana, *J. Mol. Neurosci.* 10, 163 (1998)) in der Literatur: a) in Reinigungsverfahren wurden zwei Aktivitätsspitzen in Hirnhomogenaten (H. Nakata, H. Fujisawa, *Eur. J. Biochem.* 122, 41 (1982)) entdeckt und partiell gereinigte Enzyme mit eindeutigen biochemischen Eigenschaften wurden beschrieben in Abhängigkeit von den analysierten Geweben (D. M. Kuhn, M. A. Meyer, W. Lovenberg, *Arch. Biochem. Biophys.* 199, 355 (1980)), b) die erste Generation von Antikörpern gegen TPH, gereinigt von einer Mäusema-stozytomzelllinie (P815), hat mit der Hirn-TPH nicht überkreuz reagiert (H. Nakata, H. Fujisawa, *Eur. J. Biochem.* 124, 595 (1982)), obwohl das derzeit im Handel erhältliche Antikörper tun. Bisher wurden diese Erscheinungen mit verschiedenen Phosphorylationszuständen der Proteine (C. D. Cash, *Gen. Pharmac.* 30, 569 (1998)) erklärt.

Eine fundierte Erklärung für die genannten unterschiedlichen mRNA- und Proteinmengen, sowie die widersprüchlichen Daten fehlte jedoch. Dies ist in vorliegender Erfindung gelungen.

AUFGABE-LÖSUNGZUSAMMENHANG

Vorliegend wird durch "Gene targeting" erstmals gezeigt, dass Serotonin unabhängig von zwei verschiedenen Tryptophanhydroxylaseisozytmen in peripheren Geweben und Neuronen synthetisch hergestellt wird. Des Weiteren wird erstmals eine spezifisch neuronale Tryptophanhydroxylaseisoform identifiziert. Obwohl die Aminosäuresequenzen der zwei Tryptophanhydroxylasen hoch homolog zueinander sind, zeigen die Gensequenzen nur eine geringe Ähnlichkeit, was erklärt, warum die neuronale Tryptophanhydroxylase (im folgenden als snTPH bezeichnet) jahrzehntelang unentdeckt blieb.

Die Isolierung der spezifisch neuronal exprimierten snTPH kann für die Entwicklung und Bereitstellung von neuen Präparaten zur Behandlung von neuronalen/psychiatrischen Krankheiten nützlich sein.

Demzufolge ist es eine wesentliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem neuronale und psychiatrische Krankheiten durch die Beeinflussung des Serotoninstoffwechsel durch Veränderung der Menge/Aktivität von snTPH behandelt werden. Ferner ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Nukleinsäuremoleküle und Isoform-spezifische Inhibitoren/Aktivatoren bereitzustellen, die für die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten zur Behandlung von neuronalen Erkrankungen und für die Diagnose derselben durch Beeinflussung des Serotoninstoffwechsels durch snTPH eingesetzt werden können. Weitere Aufgaben der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung.

Diese Aufgaben werden durch die Gegenstände der unabhängigen Ansprüche, insbesondere basierend auf der Bereitstellung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, deren Genprodukte unmittelbar zur Beeinflussung des neuronalen Serotoninstoffwechsels eingesetzt werden können, gelöst.

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen definiert.

Es ist bei der vorliegenden Erfindung überraschenderweise erstmals gelungen, Nukleinsäuremoleküle bereitzustellen, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer neuronalen Tryptophanhydroxylase (sNTPH) kodieren. Zur Untersuchung der physiologischen Auswirkungen des Verlustes der 5-HT-Synthese wurden Mäuse mit einem genetischen Mangel an TPH gezüchtet. Obwohl ein letaler Phänotypus dieser genetischen Manipulation erwartet wurde, wie das für Tiere mit einem Mangel an TH (Q. Y. Zhou, C. J. Quaife, R. D. Palmiter, *Nature* 374, 640 (1995)) festgestellt wurde, wurden überraschenderweise lebensfähige, homozygote TPH-Knockout-Mäuse (TPH(-/-)) erzeugt. Diesen Mäusen mangelt es an 5-HT in der Peripherie. Es konnte erstmalig festgestellt werden, dass der Wirkungsmechanismus von 5-HT bei der primären Hämostase die Freisetzung des Von-Willebrand-Faktors bedeutet (vWF). Völlig unerwartet tritt jedoch nur eine geringe Verminderung der stabilen 5-HT-Mengen in den klassischen serotonergen Hirnregionen von TPH(-/-)Mäusen auf, was zur Identifizierung einer TPH-Isoform führte, die speziell in den Neuronen exprimiert wird.

Die vorliegende Erfindung umfasst somit eine rekombinante Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit neuronaler Tryptophanhydroxylaseaktivität kodiert, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 5 (DNA-SEQUENZ MENSCH, MAUS, RATTE) dargestellten Sequenz oder Fragmente davon,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 5 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten oder Fragmente davon,
- c) Derivate der in SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 5 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für die Polypeptide mit der in SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 4 oder SEQ ID No: 6 (AMINOSÄURESEQUENZ MENSCH, MAUS, RATTE) kodieren und mindestens 80% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die biologische Aktivität der Polypeptide wesentlich reduziert ist,
- d) einer humanen genomischen Nukleinsäuresequenz, welche das Gen für sn-TPH enthält und Polymorphismen aufweist.

Es ist festzuhalten, daß der Begriff "neuronale Tryptophanhydroxylase" (sn-TPH) im Anmeldungstext alle Peptide und Proteine mit Tryptophanhydroxylaseaktivität einschließen soll.

Diese Nukleinsäuren lassen sich in eukaryontischen und prokaryontischen Organismen bevorzugt Mammalia, wie Homo sapiens (Mensch), Rattus norvegicus (Ratte) oder Mus musculus (Maus) finden. Diese Nukleinsäuren kodieren für die Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO: 2 (Homo sapiens), SEQ ID No: 4 (Mus musculus) oder SEQ ID No: 6 (Rattus norvegicus).

Diese Nukleotidsequenzen werden im folgenden als snTPH-Gene und ihre Homologen, die Aminosäuresequenzen als snTPH und ihre Homologen bezeichnet.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, die für die oben beschriebenen Proteine kodieren, insbesondere für solche mit

der in SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 4 oder SEQ ID No: 6 dargestellten Primärstruktur. Die Nukleinsäuresequenz aus Homo sapiens ist in SEQ ID No: 1 und aus Mus musculus in SEQ ID No: 3 und aus Rattus norvegicus in SEQ ID No: 5 dargestellt. Nach Isolierung und Sequenzierung sind die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen in SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 5 oder deren funktionelle Äquivalente wie z.B. Allelvarianten erhältlich. Unter Allelvarianten sind in SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 5-Varianten zu verstehen, die 60 bis 100% Homologie auf Aminosäureebene (=Identität), bevorzugt 70 bis 100 %, besonders bevorzugt 90 bis 100% aufweisen. Allelvarianten umfassen insbesondere solche funktionellen Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 5 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei wenigstens eine der wesentlichen biologischen Eigenschaften erhalten bleibt.

Homologe oder sequenzverwandte Nukleinsäuresequenzen können aus allen Säugerspezies einschließlich Mensch nach gängigen Verfahren zum Beispiel mittels Homologiescreening durch Hybridisierung mit einer Probe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder Teilen davon isoliert werden.

Hybridisierung bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al. (Sambrook et al. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) beschrieben sind.

Unter Standardhybridisierungsbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42°C und 58°C in einer wässrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 X SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50% Formamid, wie beispielsweise 42 °C in 5 X SSC, 50% Formamid zu verstehen.

DNA-Sequenzen, die mit den DNA-Sequenzen hybridisieren, welche snTPH kodieren, können z.B. aus genomischen oder cDNA-Bibliotheken beliebiger Vertebraten, bevorzugt Mammalia, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen besitzen, isoliert werden. Die Identifizierung und Isolierung derartiger DNA-Sequenzen kann dabei z.B. unter Verwendung von DNA-Sequenzen erfolgen, die exakt oder im wesentlichen die in SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 5 angegebene DNA-Sequenz oder Teile davon aufweisen, bzw. der reversen Komplemente dieser DNA-Sequenzen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (s. z.B. Sambrook et al. (1989), vide supra). Bei den als Hybridisierungssonde verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe üblicher Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit einer der oben erwähnten snTPH-Sequenzen oder einem Teil davon übereinstimmt.

Nukleinsäuresequenzen, die ein Protein mit der biologischen Aktivität einer neuronalen Tryptophanhydroxylase kodieren, umfassen auch DNA-Sequenzen, deren Nukleinsäuresequenzen zu einer der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen degeneriert ist. Die Degeneration des genetischen Codes bietet dem Fachmann u.a. die Möglichkeit, die Nukleotidsequenz der DNA-Sequenz an die Codonpräferenz (codon usage) des Zielorganismus anzupassen und die Expression dadurch zu optimieren.

Die oben beschriebenen DNA-Sequenzen umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der biologischen Aktivität einer neuronalen Tryptophanhydroxylase kodieren. Unter Fragmenten werden dabei Teile der DNA-Sequenz verstanden, die lang genug sind, um eines der beschriebenen Proteine zu kodieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Sequenzen sich von den oben beschriebenen DNA-Sequenzen an einer oder mehreren Positionen unterscheiden, aber einen hohen Grad an Homologie vorweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 25 Prozent, insbesondere eine

Identität von mindestens 40 Prozent, vorzugsweise von mindestens 60 Prozent, besonders bevorzugt von über 80 Prozent und am meisten bevorzugt von über 90 Prozent. Dabei weisen die durch diese DNA-Sequenzen kodierten Proteine eine Sequenzidentität zu den in SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 4 oder SEQ ID No: 6 angegebenen Aminosäuresequenzen von mindestens 60 Prozent, insbesondere mindestens 80 Prozent, vorzugsweise 85 Prozent und besonders bevorzugt über 90 Prozent, 95 Prozent und 98 Prozent auf. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen DNA-Sequenzen können dabei beispielsweise durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder deren Fragmente lassen sich darüber hinaus auch zur Isolierung genomicscher Sequenzen über Homologiescreening unter Verwendung der oben genannten Hybridisierungsbedingungen einsetzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die erfindungsgemäßen isolierten Proteine. Daraunter sind Proteine zu verstehen, die in SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 4 oder SEQ ID No: 6 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine daraus durch Substitution, Inversion, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhältliche Sequenz enthalten, wobei wenigstens noch eine der wesentlichen biologischen Eigenschaften des in SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 4 oder SEQ ID No: 6 dargestellten Proteins erhalten bleibt. Dabei können beispielsweise bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität etc.) ersetzt werden. Es können aber auch eine oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge vertauscht, hinzugefügt oder entfernt werden oder es können mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden. Die solchermassen gegenüber der SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 4 oder SEQ ID No: 6 veränderten Pro-

teine besitzen wenigstens 60%, bevorzugt 70 % und besonders bevorzugt wenigstens 90% Sequenzidentität zu den Sequenzen in SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 4 oder SEQ ID No: 6 berechnet nach dem Algorithmus von Altschuld et al. (1990, J. Mol. Biol., 215: 403-410, BLAST-Programm (derzeit aktuelle Version) über die gesamte Länge der Proteinsequenzen).

Unter funktionellen Äquivalenten der genannten Sequenzen sind Nukleinsäuren zu verstehen, die für Proteine kodieren, die die biologische Aktivität von snTPH aufweisen und mindestens 50 % der Aktivität der unter SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 4 oder SEQ ID No: 6 genannten Sequenzen aufweisen. Diese funktionellen Äquivalente interagieren bevorzugt mit anderen Proteinen, mit denen sie sogenannte Proteinkomplexe (Proteinheteromere) bilden.

In einer weiteren Ausführungsform gehört zu den wesentlichen biologischen Eigenschaften außerdem die spezifische Bindung von synthetischen oder natürlichen Agonisten und Antagonisten an die erfindungsgemäßen Proteine mit den in SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 4 oder SEQ ID No: 6 dargestellten Aminosäuresequenzen oder deren funktionelle Äquivalente, deren biologische Eigenschaften dadurch verändert oder moduliert wird.

Die erfindungsgemäßen Proteine und ihre funktionellen Varianten lassen sich vorteilhafterweise aus dem Gehirn von Mammalia wie Homo sapiens (u.a. humane SCLC-Zellen, SHP-77), Mus musculus oder Rattus norvegicus isolieren.

Weiter betrifft die Erfindung Nukleinsäuremoleküle, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten oder durch natürlich vorkommende oder durch gentechnische oder chemische Prozesse und Syntheseverfahren aus diesen entstanden sind bzw. von diesen abgeleitet wurden. Hierbei kann es sich beispiels-

weise um DNA- oder RNA-Moleküle, cDNA, genomische DNA, mRNA usw. handeln.

Weiterhin ist es von Vorteil, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren funktionell mit mindestens einem genetischen Regulatorelement zu den erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremolekülen (Expressionskassette, Genkonstrukt) zu verknüpfen, die die Transkription und, falls erwünscht, die Translation in der Zelle gewährleisten. Dazu werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen üblicherweise mit genetischen Regulationselementen wie Transkriptions- und Translationssignalen funktionell verknüpft. Dabei kann die Nukleinsäuresequenz in Antisense oder Sense-Richtung mit einem oder mehreren Regulationsignalen verknüpft sein. Diese Verknüpfung kann je nach gewünschter Anwendung zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Genexpression führen.

Für die Expression der in den erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremolekülen enthaltenen DNA-Sequenzen in eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen kommen grundsätzlich alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen in Frage.

Diese regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren vorhanden sind. Auch ist eine gezielte genetische Veränderung des natürlich vor den Sequenzen vorhandenen Promotors vorteilhaft. Weitere Regulationssignale wie 3' gelegene Terminatoren oder Polyadenylierungssignale oder Enhancer können funktionell in den rekombinanten Nukleinsäuremolekülen Anwendung finden.

In jedem Fall kann der Fachmann geeignete Promotoren der Literatur entnehmen oder mittels Routineverfahren aus beliebigen Organismen isolieren.

Ferner sind Transkriptions- bzw. Terminationssequenzen vorhanden, die der korrekten Beendigung der Transkription dienen, sowie der Addition eines polyA-Schwanzes an das Transkript dienen können, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben und beliebig austauschbar.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Bereitstellung von Vektoren, umfassend die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nukleinsäuremolekül, deren Verwendung zur Herstellung transgener Organismen mit erhöhter oder erniedrigter Produktion/Aktivität von snTPH dienen.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch Vektoren, insbesondere Plasmide, Kosmide, Viren, Bakteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten und ggf. für den Transfer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle auf eukaryontische oder prokaryontische Zellen eingesetzt werden können.

Darüber hinaus kann das erfindungsgemäße rekombinante Nukleinsäuremolekül oder können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren auch in Form therapeutisch oder diagnostisch geeigneter Fragmente exprimiert werden. Zur Generierung des rekombinanten Proteins können Vektorsysteme oder Oligonukleotide verwendet werden, die die Nukleinsäuren oder das rekombinante Nukleinsäuremolekül um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und

damit für veränderte Polypeptide kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen (TAGs).

Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer Homologen, funktionellen Äquivalente oder Derivate, des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls oder der Vektoren, ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise eukaryontische oder prokaryontische Wirtsorganismen wie Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Befvorzugte Organismen sind Bakterien wie Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus oder Pseudomonas, eukaryotische Mikroorganismen wie Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus, höhere eukaryotische Zellen aus Mensch oder Tier, wie beispielsweise die Zelllinien COS7, NG108-15 und P815.

Diese transgenen oder rekombinanten Organismen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie entweder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihre Allelvarianten, ihre Homologen, funktionellen Äquivalente oder Derivate, das rekombinante Nukleinsäuremolekül oder die Vektoren natürlicherweise nicht enthalten oder nicht an dieser Stelle im Genom oder in der Zelle enthalten oder aber dass der natürliche Promotor der erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle so genetisch manipuliert wurde, dass die entsprechenden Gene entsprechend stärker oder schwächer exprimiert werden.

Dabei kann der beschriebene Wirtsorganismus mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül oder mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor enthalten.

Vorteilhaft kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, z.B. Mäusen, Ratten, Schafen, Rindern oder Schweinen zur Expression gebracht werden. Auch transgene Pflanzen sind denkbar, wobei es sich hier um Proteingewinnung durch molecular farming handeln könnte. Bei den transgenen Organismen kann es sich auch um sogenannte Knock-Out-Tiere handeln.

Dabei können die transgenen Tiere eine funktionelle oder nicht funktionelle erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder ein funktionelles oder nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt enthalten.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder Teile davon zur Gentherapie in Säugetieren, z.B. Mensch. Auch zu den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder Teilen davon komplementäre Sequenzen können zur Gentherapie verwendet werden. Gentherapie umfasst dabei alle Therapieformen, die entweder Sequenzen nach Anspruch 1 in den Körper oder Teile davon einbringen, oder die Expression von Sequenzen nach Anspruch 1 beeinflussen. Dazu können Oligonukleotide, z.B. Antisense- oder Hybrid-RNA-DNA Oligonukleotide, mit beliebigen Modifikationen, die Teile der Sequenzen gemäß Anspruch 1 enthalten, benutzt werden. Ebenfalls können virale Konstrukte, enthaltend eine Sequenz nach Anspruch 1 oder Teile davon benutzt werden.

Ein weitere vorteilhafte Ausführungsform ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, des erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküls oder der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenz zur Identifizierung/Auffindung von Proteinen, die zu einem Protein, das durch die Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 2 oder 3 kodiert wird, spezifische Bin-

dungsaaffinitäten aufweisen, oder zur Identifizierung von Nukleinsäuren, die für Proteine kodieren, die zu einer Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 2 oder 3 spezifische Bindungsaaffinitäten aufweisen. Vorteilhaftweise werden hierzu das Two-Hybrid System oder andere biochemische Verfahren allein oder in Kombination verwendet. Es lassen sich so Interaktionsdomänen des erfindungsgemäßen Proteins und andere konservierte Bereiche und damit pharmakotherapeutische Interventionspunkte bestimmen.

Daher ist ein weiterer Aspekt der Erfindung die Verwendung des Two-Hybrid Systems oder biochemischer Verfahren allein oder in Kombination zur Identifizierung der Interaktionsdomänen von sNTPH und die Verwendung zur pharmakotherapeutischen Intervention.

Eine weitere vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 als Marker für humane Erbkrankheiten, insbesondere neuronale Erkrankungen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 2 seiner funktionellen Äquivalente oder von Peptidfragmenten davon als Antigen zur Erzeugung von spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörpern oder Antikörpergemischen gerichtet gegen Proteine gemäß Anspruch 2 oder 3. Mit Antikörpern sind sowohl polyklonale, monoklonale, humane oder humanisierte oder rekombinante Antikörper oder Fragmente davon, single chain Antikörper oder auch synthetische Antikörper gemeint. Unter erfindungsgemäßen Antikörpern oder deren Fragmente sind prinzipiell alle Immunoglobulinklassen oder ihre Subklassen oder deren Mischungen zu verstehen. Als Fragmente seien alle verkürzten oder veränder-

ten Antikörperfragmente mit einer oder zwei dem Antigen komplementären Bindungsstellen genannt. Auch genmanipulierte nicht-verkürzte Fragmente können vorteilhaft verwendet werden. Die Antikörper oder Fragmente können allein oder in Mischungen verwendet werden.

Die Antikörnergene für die gentechnischen Manipulationen lassen sich in einer dem Fachmann bekannten Weise beispielsweise aus den Hybridomzellen isolieren. Dazu werden Antikörperproduzierende Zellen angezogen und die mRNA bei ausreichender optischer Dichte der Zellen über Zell-Lyse mit Guanidinium-thiocyanat, Ansäuern mit Natriumacetat, Extraktion mit Phenol, Chloroform/Isoamylalkohol, Fällungen mit Isopropanol und Waschen mit Ethanol aus den Zellen in bekannter Weise isoliert. anschließend wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase cDNA aus der mRNA synthetisiert. Die synthetisierte cDNA kann direkt oder nach genetischer Manipulation beispielsweise durch site directed mutagenesis, Einführung von Insertionen, Inversionen, Deletionen oder Basenaustausche in geeignete tierische, pilzliche, bakterielle oder virale Vektoren inseriert und in den entsprechenden Wirtsorganismen exprimiert werden.

Spezifische Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Proteine können sich sowohl als diagnostische Reagenzien als auch als Therapeutika bei Krankheitsbildern, die u.a. durch Veränderungen des Serotoninstoffwechsels charakterisiert sind, eignen.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen gemäß Anspruch 1, ihre funktionellen Äquivalente, Homologe oder Derivate oder deren Fragmente, die von ihren kodierten Proteinen mit den erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen, sowie davon abgeleitete Reagenzien (Oligonukleotide, Antikörper, Peptide) können zur Feststellung einer Prädisposition, zur Diagnose, zur Therapie

und zum Monitoring von neurologischen Erkrankungen, insbesondere im Zusammenhang mit den serotonergen Effekten in der Verhaltensphysiologie, verwendet werden.

Die Beeinflussung der sNTPH erfolgt auf folgenden Wegen:

Es werden spezifische Inhibitoren der neuronalen TPH-Isoformen entwickelt, die auf den beschriebenen molekularen Unterschieden der TPH-Isoformen beruhen, andererseits auch Inhibitoren, die nicht Blut-Hirnschranken-gängig sind. Spezifische Inhibitoren für die TPH-Isoformen können *in vitro* durch den Fachmann bekannte Standard-Screeningmethoden gefunden werden, da die erhaltenen cDNAs der sNTPH mit Hilfe von Expressionssystemen zur gezielten Expression der reinen Isoformen verwendet werden können.

Diesen Inhibitoren kommen neben dem diagnostischen Nutzen auch therapeutische Anwendungsmöglichkeiten zu, denn erhöhte Serotonin-Spiegel im ZNS werden bei einer Vielzahl an Komplikationen aufgefunden.

Die Beeinflussung der sNTPH-Regulation (Aktivität und/oder Menge des sNTPH) kann erfundungsgemäß auf folgenden Wegen erfolgen:

Die spezifische Herunterregulierung der sNTPH erfolgt molekularbiologisch mit Ribozymen, Antisense-Oligonucleotiden oder durch Antisens-RNA-Expression, wobei die Sequenzunterschiede der Isoform mRNAs die Beeinflussung jeweils nur einer mRNA erlauben. Außerdem wird gemäß der Erfindung auch mit pharmakologischen Ansätzen mit Hilfe spezifischer TPH-Inhibitoren, wie beispielsweise p-Chlorophenylalanin oder p-Ethinylenylalanin, gearbeitet.

Die Serotonin-Produktion wird molekularbiologisch bevorzugt durch gewebspezifische Überexpression der sNTPH stimuliert, pharmakologisch können beispielsweise die Vorgänger-Substanz, 5-Hydroxytryptophan, oder auch substituierte Analoge verabreicht werden, nicht zuletzt aber auch Serotonin selbst.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Diagnostik von neuronalen Erkrankungen ist dadurch gekennzeichnet, daß eine spezifische Inhibierung der peripheren Serotoninbiosynthese durchgeführt wird, nachfolgend die aus dem CNS stammenden Metabolitenkonzentrationen bestimmt werden und anhand einer Vergleichskurve der Krankheitsgrad ermittelt wird. Dazu ist es notwendig, Substanzen einzusetzen, die nicht Blut-Hirn-Schranken-gängig sind.

Vorteilhaft ist weiterhin die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, der erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle oder der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen zur Behandlung von Störungen des Schlafs, der Angst, des Alkoholkonsums, des Drogenkonsums, der Nahrungsaufnahme und des sexuellen Verhaltens, dadurch gekennzeichnet, dass der Serotonininspiegel durch Modulation der Genexpression von sNTPH oder Veränderung der Aktivität von sNTPH beeinflusst wird.

In einer weiteren Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, die erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle oder die erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen zur Entwicklung und Herstellung eines Kombinationspräparats eingesetzt, umfassend ein Protein nach Anspruch 2 oder 3 und mindestens ein weiteres Protein, insbesondere zur Regulation des Serotonin-Stoffwechsels. Neben einem herkömmlichen Trägermaterial kann das Kombinationspräparat grundsätzlich al-

le vorteilhaften pharmazeutisch verträglichen Proteine enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Kombinationspräparat als weiteren Wirkstoff eine periphere Tryptophanhydroxylase zur gleichzeitigen Behandlung von neuronalen/psychiatrischen und thrombotischen Erkrankungen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall (periphere und die neuronale Serotoninproduktion werden gleichzeitig beeinflusst durch Erhöhung oder Erniedrigung). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass bei der Anwendung von SSRI (serotonin specific reuptake inhibitors)-Antidepressiva in der psychopharmakologischen Therapie in einigen Fällen ernsthafte Blutungs-Komplikationen hervorrufen. Durch Einsatz von Präparaten mit spezifischer neuronaler Wirkung kann dies unterbunden werden. Dementsprechend ist eine weitere Ausführungsform der Erfindung das beschriebene Kombinationspräparat zur Behandlung von Blutungsepisoden in der psychopharmakologischen Behandlung von Depressionen mit Antidepressiva, die auf den Serotonin-Wiederaufnahme-Transporter wirken, enthaltend Antidepressiva und von Willebrand-Faktor.

BEISPIELE

Die beschriebene Erfindung wird nunmehr durch die folgenden Beispiele erläutert. Verschiedenartige, andere Ausgestaltungen werden für den Fachmann aus der vorliegenden Beschreibung ersichtlich. Es wird jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, daß die Beispiele, die Beschreibung der Abbildungen und die Abbildungen lediglich zur Erläuterung vorgesehen und nicht als Einschränkung der Erfindung anzusehen sind.

Soweit nicht anders angegeben wurde bei der experimentelle Durchführung entsprechend den Vorschriften in Ausubel et al. (eds.), 1998, Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York und Sambrook et al. (eds.), 1989, Molecular cloning: A laboratory manual. CSH Laboratory Press, New York" verfahren.

AUSFÜHRUNGSBEISPIEL 1

UNVERÄNDERTE 5-HT-BIOSYNTHESE IM ZNS VON TPH(-/-) MÄUSEN.

Dazu wurde ein "Gene-targeting"-Vektor geschaffen, der eine Substitution einer transkriptionell aktiven neomycinbeständigen Genkassette für die 3'-Kodierungsregion des ersten translatierten Exons des tph-Gens (Abb. 1A) herbeiführte, um die TPH-Expression zu deaktivieren. Mäuse mit einem TPH-Mangel wurden mit "Gene-targeting"-Standardmethoden (Walther et al. J. Biol. Chem. 273, 11867 (1998)) geschaffen. Mit PCR (Abb. 1B) und Southern Blots mit einer äußeren (Abb. 1C) und einer inneren Sonde, die identische Fragmente feststellte, wurden die Tiere, die für die mutierten tph-Allele heterozygot oder homozygot sind, identifiziert.

Der Verlust von TPH-Aktivität in "gene-targeted" Mäusen wurde zunächst in Vollblutproben unter Anwendung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit einem fluorimetrischen (HPLC-FD; Abb. 1D) und elektrochemischen (HPLC-ECD; Abb. 1D und E) Nachweis gezeigt. Die Wildtyp- (TPH(+/+)) Nachkommenschaft eines Elternpaares und die durch Inzucht erzeugten Labormäuserassen C57BL/6 und 129SvJ, von denen die TPH(-/-)-Tiere abstammen, enthalten die erwarteten hohen Konzentrationen von 5-HT, während bei TPH(-/-)-Tieren kein 5-HT mit diesen empfindlichen Versuchen nachweisbar war. Da die Nachweisgrenze bei Vollblut 5pg/µl betrug, musste 5-HT unter 1 % der Normalmengen in den Thrombozythen dieser Mäuse betragen.

Darüber hinaus waren gastrointestinale Enterochromaffinzellen, die die Quelle für die großen 5-HT-Pools im Vollblut sind, frei von 5-HT bei TPH(-/-)-Mäusen, wie immunhistochemisch nachgewiesen wurde (Abb. 1F), während überraschenderweise eindeutige Spuren von 5-HT (weniger als 4 % des normalen) im Zwölffingerdarm von TPH(-/-)- Mäusen unter Anwendung von HPLC (Abb. 1D) nachgewiesen wurden.

Es ist höchst bemerkenswert, dass nur geringe Rückgänge der 5-HT-Mengen und seines wichtigsten Metaboliten, der 5-Hydroxyindole-3-Essigsäure (5-HIAA), in den serotonergen Projektionsbereichen der TPH(-/-)-Mäusehirne zu verzeichnen waren, die nur statistische Bedeutung im Hippokampus gegenüber TPH(+/+)-Mäusen (Abb. 1E) erreichten. Die 5-HT-Mengen von Labormäuserassen (C57/BL/6 und 129SvJ) unterscheiden sich mehr voneinander in den untersuchten Hirnregionen als die 5-HT-Mengen von TPH(-/-)-und TPH(+/+)-Mäusen. Jedoch enthält interessanterweise die Epiphyse von TPH(-/-)-Mäusen weniger als 1 % des 5-HT und 5-HIAA, das bei TPH(+/+)-Mäusen (Abb. 1E) festgestellt wurde.

Das Vorhandensein von 5-HT und TPH im CNS wurde qualitativ des weiteren durch immunhistochemische Analysen bestimmt. In den Nuclei Raphe (Abb. 1G) waren nur minimale Unterschiede in den 5-HT-Mengen (Abb. 1H) und der TPH-Expression (Abb. 1I) nachweisbar. Somit spiegelte das Targeting des *tph*-Gens eine unerwartete Trennung der 5-HT-Biosynthese im CNS und im peripheren Gewebe wider.

Um die möglichen Auswirkungen der marginal veränderten zentralen 5-HT-Mengen zu untersuchen, wurden Verhaltensversuche an TPH(-/-)- und an Kontrollmäusen durchgeführt. Es konnten in Elevated-plus-maze- und Hole-board- und Water-maze-Tests, die auf ein mit 5-HT verbundenes Verhalten hinweisen, keine wesentlichen Unterschiede im Verhalten der Tiere mit verschiedenen Genotypen nachgewiesen werden.

AUSFÜHRUNGSBEISPIEL 2. IDENTIFIKATION EINER NEURONALEN TPH.

Veranlasst durch die in Ausführungsbeispiel 1 beschriebenen Erkenntnisse wurde nach dem Grund für die verbleibende TPH-Expression im Hirn der TPH(-/-)-Tiere gesucht. Es wurde die Existenz eines zweiten, noch nicht entdeckten Genstandortes, der eine neurospezifische TPH-Isoform kodiert, angenommen, da die immunhistochemischen Versuche (Abb. 1I) und Western Blots (Daten werden nicht angegeben) das Vorhandensein eines TPH-Proteins im Hirn von TPH(-/-)-Tieren, in der Größe ähnlich dem bekannten TPH, zeigten.

Nach dem Screening der Datenbank HighThroughput Genomic Sequences (HTGS) der GenBank unter Verwendung kurzer, translatierter TPH-Sequenzen wurde ein menschlicher genomischer Klon auf

Chromosom 12 (GenBankzugang AC023966) mit einem offenen Leserahmen, sehr ähnlich dem TPH-Exon 4, jedoch anders als PAH, das ebenfalls am Chromosom 12 liegt, erhalten. Eine weitere Analyse der Sequenz zeigte das Vorhandensein anderer putativer Exone. Weiterhin wurde ein genomischer Rattenklon (AC099197) gefunden, der auch die putativen Exone enthält. Es wurden Primär entwickelt, die auf Teilen dieser Sequenzen basieren, die den Exonen 4 und 6 der Mäuse-TPH homolog sind. Damit wurde ein cDNA-Fragment aus dem Hirn von TPH(-/-)-Mäusen erhalten, das sich von den bekannten TPH, PAH und TH der Maus unterscheidet. Gestützt auf die Sequenz dieses Fragments wurde die cDNA (neuer GenBankeintrag: AY090565) der neuronalen TPH in voller Länge bei Verwendung von 5'- und 3'-RACE gewonnen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses Enzyms zeigt eine Ähnlichkeit mit der klassischen Maus-TPH-Sequenz von 86 % (Abb. 2A).

Diese cDNA wurde in einen eukaryotischen Expressionsvektor geklont und COS7-Zellen, die keine endogene TPH-Aktivität aufweisen, vorübergehend transfiziert. Homogenate transfizierter Zellen zeigten eine Tryptophanhydroxylationsaktivität, die die Spezifität dieses Hirnenzyms bestätigt (Abb. 2B).

Bei Anwendung von RT-PCR konnte die Expression dieser zweiten TPH-Isoform in Ratten (neuer GenBank-Eintrag: AY098915) bestätigt und eine homologe EST-Sequenz für Hühner (AL584678) gefunden werden, die sich von der bekannten Hühner-TPH (GGU26428) unterscheidet, sowie EST-Sequenzen aus Zebrafischhirn (BI475520, BI981676 und BM025115), außer einer weiteren EST-Sequenz aus einem Zebrafischovarium (BI 979302) mit hoher Homologie zur bekannten TPH. Daher scheint eine sich gegenseitig ausschließende und zellspezifische Expression dieser beiden TPH-Isoformen in Wirbeltieren aufzutreten. Es wurde

auch das menschliche Homolog der neuen TPH-Isoform (neuer Gen-Bankeintrag: AY098914) geklont und sequenziert.

Die bereits bekannte TPH mRNA wurde im Zwölffingerdarm und auch in der Thymusdrüse und in der Milz nachgewiesen, jedoch nicht im Hirn, unter Anwendung von 20 µg Gesamt-RNA in RNase-Schutzversuchen, speziell für die beiden TPH-Isoformen (Abb. 2C). Im Gegensatz dazu ist die neuronale TPH ausschließlich im Hirn nachweisbar und wird dort stark exprimiert (Abb. 2C). Daher wird die klassische TPH als peripherne TPH, pTPH, und das neue Enzym als neuronale TPH, snTPH, bezeichnet.

Darüber hinaus unterstützt auch die Analyse von P815 mRNA eine sich gegenseitig ausschließende zellspezifische Expression von snTPH und pTPH, da nur pTPH mRNA, jedoch nicht snTPH mRNA, durch spezifische RNase-Schutzversuche nachgewiesen werden kann (RPA, Abb. 2D), wobei des weiteren nachgewiesen wurde, warum Anti-TPH-Antisera, die gegen P815 TPH erzeugt wurden, nicht das Hirnstammenzym nachweisen konnten. Gemäß der sich gegenseitig ausschließenden zellspezifischen Expression wird vorliegend gezeigt, dass Mengen von snTPH mRNA im Hirn von TPH(-/-)-Mäusen nicht beeinträchtigt werden (Abb. 2E). Des weiteren weisen das Mittelhirn und Pons von den gesamten RNA-Proben von Kontrolltieren, die in den RPAs verwendet wurden, etwa 50 Mal mehr snTPH auf, als pTPH mRNA (Abb. 2F).

Somit zeigen die Ergebnisse an TPH(-/-)-Mäusen, dass 5-HT im ZNS und peripherem Gewebe durch zwei unabhängig gesteuerte serotonergene Systeme synthetisch hergestellt wird, definiert durch TPH-Isoformen, die von verschiedenen Genen mit sich gegenseitig ausschließenden gewebespezifischen Expressionsmustern kodiert wurden, was leicht viele früher rätselhafte Daten erklärt.

Beschreibung der Abbildungen

Abbildung 1

Züchtung von TPH(-/-)Mäusen und quantitative Bestimmung von Trp und 5-HT im peripheren Gewebe und von Trp, 5-HT und 5-HIAA in ausgewählten Hirnbereichen unter Verwendung von HPLC-FD und immunhistochemischer Färbung (A) Schematische Darstellung des Targeting-Verfahrens. Die ersten vier der 11 Exons des TPH-Gens werden dargestellt. Das Knockoutkonstrukt (KO) wurde durch die homologe Rekombination in ein Allel von ES-Zellen integriert, wobei das erste Kodierungsexon (Exon 2) des TPH-Gens zerstört wurde. Des weiteren enthält die integrierte Neomycinbeständigkeitsskassette (neo^r) ein Transkriptionsbeendigungssignal (pA). Die Positionen der analytischen PCR-Amplicons für die Identifizierung der wilden und der KO-Allel werden angegeben sowie die Positionen der inneren und äußeren Sonden und die Eco RI-Stellen (fett RI), die für Southern Blot verwendet werden. Verengungsstellen: RI: Eco RI; Hd: Hind III; Bm: Bam HI; Sc: Sac I. (B) Agarosegelelektrophorese analytischer PCR-Produkte. Wie in (A) angegeben, weist der PCR-Versuch an wilden Tieren ein 1.1 kb-Fragment nach, während das KO-Allel als 1.3 kb-Fragment nachgewiesen wird. (C) Southern Blot von Eco RI-verdauter genomischer DNA. Wie in (A) angegeben, weisen beide Sonden bei wildlebenden Tieren ein 10 kb Eco RI-Fragment nach, während bei KO-Tieren ein kürzeres 8 kb-Fragment nachgewiesen wird, aufgrund der Eco RI-Stelle, die in der Neomycinbeständigkeitsskassette enthalten ist. (D) Trp und 5-HT im Vollblut und Zwölffingerdarm von 129SvJ, C57BL/6, TPH(-/-) und TPH(+/+)-Mäusen, n.d., unterhalb der Nachweisgrenze des ($< 5 \text{ pg}/\mu\text{l}$). *, statistisch signifikant ($p < 0.05$), verglichen mit allen anderen untersuchten Mäuselinien. (E) Trp, 5-HT, and 5-HIAA im Ammonshorn und Frontalkortex, zwei serotonergen Projektionsbereiche von 129SvJ, C57BL/6,

TPH(-/-), und TPH(+/+) -Mäusen und in der Epiphyse von TPH(-/-) und TPH(+/+) -Mäusen *, statistisch signifikant ($p < 0.05$), im Vergleich zu allen anderen untersuchten Mäuselinien. +, statistisch signifikant ($p < 0.05$), im Vergleich zu TPH(+/+)-Mäusen, jedoch nicht zu anderen Labormauslinien. (F) Immunhistochemischer Vergleich von 5-HT im Zwölffingerdarm von TPH(-/-) (links) und Wildtyp (rechts) Mäusen. Eine Anti-5-HT-Färbung fehlt in Zwölffingerdarmschnitten von TPH(-/-) Mäusen, während Enterochromaffinzellen bei TPH(+/+)-Mäusen eine starke Färbung zeigen. (G - I) Immunhistochemischer Vergleich von 5-HT (E) und TPH (F) in Nuclei Raphe von TPH(-/-) (links) und Wildtyp (rechts) Mäusen. (G) Schematische Darstellung der Fläche der Vibratomschnitte. Kleines Nebenbild: der vertikale Strich zeigt die Position bei seitlicher Ansicht des Hirns. Großes Nebenbild: Zoom der gefärbten Bereiche, wie auf (H) und (I) dargestellt. 4n: Nervus trochlearis oder seine Wurzel; DRD: Dorsaler nucleus raphe, dorsaler Teil; DRV: Dorsaler nucleus raphe, ventraler Teil; DRVL: dorsaler nucleus raphe, ventrolateraler Teil; mlf: medialer Längsfasciculus; MnR: Mittlerer nucleus raphe; PMnR: paramittlerer nucleus raphe; scp: Pedunculus cerebellaris superior (brachium conjunctivum). (H) Anti-5-HT-Färbung von TPH(-/-) und TPH(+/+)-Mäusen. (I) Anti-TPH-Färbung von TPH(-/-) und TPH(+/+)-Mäusen.

Abbildung 2

Sequenz und Expression von Maus-snTPH (Mus musculus). (A) Der Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von snTPH bis pTPH zeigt die hohe Homologie beider Enzyme miteinander, bei höchster Ähnlichkeit im katalytischen Bereich (aa 149 bis 450). (B) Umgekehrte Phasen-HPLC-FD-Chromatogramme der TPH-Aktivitätsversuche. (Oben) Nichtransfizierte COS7-Zellen.

(Mitte) COS7-Zellen, vorübergehend mit einem eukaryotischen Expressionsvektor, der die Maus-snTPH cDNA enthält, transfiziert. (Unten) P815 Mausmastozytomzellen mit einer hohen endogenen TPH-Aktivität. 5-hydroxyliertes Tryptophan (5-HTP) eluiert mit einer Verweilzeit von 5 Min. (C) RNase-Schützversuche mit spezifischen Sonden für die zwei Isoformen zeigen die Anwesenheit von pTPH mRNA im Zwölffingerdarm, der Thymusdrüse und in der Milz von Wildtyp-Tieren, jedoch nicht bei TPH(-/-)-Mäusen. snTPH mRNA ist ausschließlich im Hirn vorhanden, unabhängig vom Genotyp (D) RNase-Schützversuche speziell für snTPH (Bahn 1-3) und pTPH (Bahn 4-6): Bahn 1:30 µg Hirn-RNA, Bahn 2: 30 µg Zwölffingerdarm-RNA, Bahn 3: 30 µg P815 RNA, Bahn 4: 80 µg Hirn-RNA, Bahn 5: 80 µg Zwölffingerdarm-RNA, Bahn 6: 10 µg P815 RNA. P815-Zellen exprimieren sehr hohe Mengen an pTPH mRNA, jedoch keine nachweisbare snTPH mRNA. (E) Die quantitative Bestimmung von snTPH mRNA in Hirn-RNA von Wildtyp-Tieren und TPH(-/-)-Mäusen, unter Anwendung des Ranse-Schützversuchs, zeigt keinen Einfluß der pTPH-Ablation. β-Actin mRNA wurde als interner Standard verwendet. (F) Vergleich von pTPH (links) und snTPH mRNA (rechts) in Pons und der Mittelhirn-RNA von Wildtyp-Tieren. Bahn 1-3: 50 µg RNA für pTPH, Bahn 4-6: 30 µg RNA für snTPH. β-Aktin mRNA wurde als interner Standard verwendet.

SEQ ID No. 1: cDNA-Sequenz der neuronalen Tryptophanhydroxylase (nTPH) des Menschen (Homo sapiens)

1 cattgtctt cagcaccagg gttctggaca ggcggccaaag caggcagctg atcgcacgcc
61 cttccctctc aatctccgccc agcgctgcta ctgcccctct agtacccctt gctgcagaga
121 aagaatatta caccgggatc catgcagccca gcaatgatga tttttccag taaatactgg
181 gcacggagag gttttccct ggattcagca gtgcccgaag agcatcagct acttggcagc
241 tcaacactaa ataaacctaa ctctggccaa aatgacgada aaggcaacaa gggaaagcagc
301 aaaaatgtaaag ctgttaccga aagtggcaag acagcagttt ttttcttctt gaagaatgaa
361 gttggatggat tggtaaaagc actgaggctc tttcaggaaa aacgtgtcaa catggttcat
421 attgaatcca gggaaatctcg gcaagaagt tctgaggttg aatctttgt ggactgtgag
481 tggggaaaaa cagaattcaa tgagotcatt cagttgctga aatttcaaact cactattgtg
541 aegctgaatc ctccagagaa ctttggaca gaggaagaag agctagagga ttttttttgg
601 tccccctcgga agatctctga gttagacaaa tgctctcaca gagttctcat gttatggttat
661 gagcttgatg ctgaccaccc aggattnaag gacaatgtt atcgacagag aagaaatgt
721 ttgtggatg tggccatggg ttataaatat ggtcagccca ttccccagggt ggagtataact
781 gaagaagaaa ctaaaacttg gggtggatgtt ttccgggagc tctccaaact ctatcccact
841 catgttgcgc gagatgtttt gaaaaacttc cttctgctga ctaaatactg tggctacaga
901 gaggacaatg tgcctcaact cgaagatgtc tccatgttcc taaaagaaaag gtctggcttc
961 acggtgagggc cggtggttgg atacctgagc ccacgagact ttctggcagg actggctac
1021 agatgttcc actgttacca gtcacatccgg catggctcag atccccctcta cccccccagaa
1081 ccagacacat gccatgaact ctgggacat gttccactad ttgcggatcc taagtttgc
1141 cagttttcac aagaaatagg tctggcgctc ctgggagcat cagatgaaga tggatggaaa
1201 ctatccacgt gctatttctt cacaatcgag ttggcccttt gcaagcaaga agggcaactg
1261 cgggcataatg gagcaggact cttttccctcc attggagaat taaaagcacgc cttttctgac
1321 aaggcatgtg taaaagccctt tgacccaaag acaacttgc tacaggaatg ctttatcacc
1381 accttccagg aaggctactt tgttttagaa agttttgtaaag aaggccaaaga aaagatgagg
1441 gactttgcaa agtcaattac ccgtcccttc tcgtataact tcaatcccta cacacagat
1501 attgaaattc taaaagacac cagaagtatt gaaaatgtgg tgcaggaccc tcgcagcgac
1561 ttgaatacag tggatgtatgc tttaaadaaa atgaaccaat atctggggat ttgatgcctg
1621 gaaatgtt gttgcagca tgatctttt ggggcttgc agcagttcag tcaatgtcat
1681 ataacgc当地 taacccctg tgcataatgg tggctaaataa gcatgc当地 ccatatatct
1741 ataccatctt gtaactcact gtgttagtat ataaagcacc ataagaaaatc caatggcaga
1801 taacctgaaa taacgttata tgttttaaaca tcttaaaaag atttgacatt cctgc当地
1861 gtccttaacc aaactgc当地 tagttaaaaat ttgtaaacaaa tagcccttctt atgagtc当地
1921 ttatgc当地 ttcttttcc agatctaagg cttccctctg tggctaaataa ataaaatgaa
1981 aaaaagcaggtaatgtt ccattttccaa tagtacgt gtttccacgc attatgttgc
2041 ataaacccag aattgttagga aacttcccat cacaataaca aaggttcaat attctatcc
2101 aaaaatgtt gaggttaacac agcagttgga atgatttttta ggttgc当地 ttacacaatg

2161 caagaaaaca ccttttaca aatggaaatta tgttaggttgc gttgaccccttg tagaacctga
2221 gttatgacaa gcttcctgaa gtatttggaa agatagttact tccggaaagg acatttaggaa
2281 agactaaaca gtggacaatc aatcttggaa ctatgaattt tatgtctggaa: taaagtaat
2341 tatcatgttc

SEQ ID No. 2: Aminosäuresequenz der neuronalen Tryptophan-hydroxylase (nTPH) des Menschen (Homo sapiens)

MQPAMMMFSSKYWARRGFSLDSA VPEEHQLLGSS TLNKPNSGKN
DDKGNKGSSKREAATESGKTAVVFSLKNEVGGLVKA LRLFQEKRVN MVHIESRKSR
SSEVEIFVDCECGKTEFNELIQLLKFTTIVTLNPPENIWT EEELEDV PWFFRKISE
LDKCSHRVLMYGS ELDADHPGFKDNVYRQRK YFVDVAMGYKYGQPIPRV
EYTEEETK TWGVVFRELSKLYPTHACREYLKNFPLLT KYCGYREDNVPQLEDV
SMFLKERSGFTVR PVAGYLSPRDFLAGLAYRVFHCTQYIRHGS
DPLYTPEPDTCHELLGHVPLLA DPKFAQ FSQEIGLASLGAS
DEDVQKLATCYFFTIEFGLCKQEGQLRAYGAGLSSIGELKHAL
DKACVKAFDPKTCLQECLITT FQEAYFVSE SFEAKEKMRDFAKSITR
PFSVYFNPY TQSIEILKDTRSTENVVQDLRSDLNTVCDALNKM
NQY LGI

SEQ ID No. 3: cDNA-Sequenz der neuronalen Tryptophanhydroxylase (nTPH) der Maus (*Mus musculus*)

1 cactgtcttt cagcaccagg gttctggaca gcgccccag cagggcagctg ccactgcagt
61 tcctccttca tctctgccaa ggccgccccct ctggtcccccc ctgctgctga gaaagaaaaat
121 tacatcgaaa gccatgcaggc cccgaatgtat gatgttttcc agtaaaatact gggccaggag
181 aggggttgtcc ttggattctg ctgtgccaga agatcatcag ctacttggca gcttaacacaca
241 aaataaggct atcaaaaagcg aggacaagaa aagcggcaaa gagccccggca aaggcgacac
301 cacagagagc agcaagacag cagttgtgtt ctcccttgaag aatgaagttg gtgggctggt
361 gaaaggcactt agactattcc agggaaaaaca tgtcaacatg ctccatatacg aatccaggcg
421 gtccccggcga agaagtctg aagtcgaaaat ctccgtggac tgcaatgtg gaaaaacggg
481 attcaatgag ctcatccagt tgctgaaatt tcagaccacc atttgtgaccc tgaatccggcc
541 tgagagcatt tggacggagg aagaagatct cgaggatgtg ccgtggttcc ctccggaaagat
601 ctctgagttt gacagatgtt ctcacccgagt cctcatgtac ggcacccgagc ttgatgccc
661 ccatccagga tttaaggaca atgtctatcg acagaggagg aagtattttg tggatgtggc
721 catgggctat aaatatggtc agcccatcc cagggtcgag tacatagaag aagagactaa
781 aacttgggggt gttgtgttcc gggagctctc caaacttotac ccgactcatg cttggccggga
841 gtacactgaaa aacccctcccccc tgctgaccaa gtactgtggc tacaggaaq acaacgtggc

SEQ ID No. 4: Aminosäuresequenz der neuronalen Tryptophan-hydroxylase (nTPH) der Maus (*Mus musculus*)

MQPAMMMFSSKYWARRGLSLDAVPEDHQLGSLTQNKAIKSED
KKSGKEPGKGDTTESSKTAVVFSLKNEVGGLVKALRLFQEKHVNMLHIESRRSRRSS
EVEIFVDCECGKTEFNLIELQLLKFQTTIVTLNPPESIWTTEEDLEDVPWFPRKISELD
RCSHRLVLMYGTTELADHPGFKDNVYRQRRKYFVDVAMGYKYGQPIPRVEYTEEETKTW
GVVFRELSKLYPTHACREYLNLPLLTKYCGYREDNVPOLEDVSMFLKERSGFTVRPV

AGYLSPRDFLAGLAYRVFHCTQYVRHGSDEPLYTPEDTCHELLGHVPLLADPKFAQFS
 QEIGLASLGASDEDVQKLATCYFFTIEFGLCKQEGQLRAYGAGLLSSIGELKHALSDK
 ACVKSFDPKTTCLQECLITTFQDAYFVSDSFEAKEKMRDFAKSITRPFVYFNRYTQ
 SIEILKDTRSIENVVQDLRSDLNTVCDALNMNQYLGI

SEQ ID No. 5: cDNA-Sequenz der neuronalen Tryptophan-
 hydroxylase (nTPH) der Ratte (*Rattus norvegicus*)

1 cagggttctg gacagcgcct cgagcagcca gctgccgctc accttcctcc tacatctctg
 61 ccaaggctgc ccctctgtat ccccctgtg ctgagaaaaga aaattacatc gggatccatg
 121 cagcccgcaa ttagatgttt ttccagtaaa tactggccca ggagagggtt gtccttggat
 181 tcagcggtgc cagaagagca tcagatactt ggccggttaa cacaataaa ggctaccgct
 241 agcaaaaagcg aggacaagag aagccggccaa gacacttcgg agagoagcaa gactgcgtt
 301 gtgttctccc tgaagaatga agttggcgaa ctgggtgagag cactgagact cttccaggg
 361 aaacacgtca acatgtcca tattgaatcc agggaggccc ggcgaagaag ttctgaagtc
 421 gaaaatcttcg tggactgtga atgtggccaa acagaattca acgagctcat tcagttgtct
 481 aagtttcaga ccaccattgt gacgctgaat ccacctgaca acatttggac ggaggaagaa
 541 gaactagagg atgtgccgtg gttccctcgg aagatctctg agtttagacag atgtcttcac
 601 agagtccctca tgtacggcac cgagcttgac gcccaccacc caggattcaa ggacaacgtc
 661 tatacgacaga ggaggaagta ttttgtggat gtggccatgg ttataaaata tggccagccc
 721 attcccgagg tggaaatacac agaagaagag actaaaactt ggggtgttgt gtttggag
 781 ctctccaaac tctatccccat tcatgtttgc cgagagtacc tgaaaaaactt cccctgtg
 841 accaagtact gcccgtacag ggaagacaac gtcccgccgc tggaaagacgt ctccatgttt
 901 ctgaaaagagc gatctggctt cacagtgaga ccagtggctg gctacctgag cccaaagagac
 961 ttccctggctg ggctggccta cagagtattc cactgcactc agtacgtgcg goatggctcc
 1021 gacccccctt acaccccgga accagacaca tgccatgagc tcctgggaca tggccactg
 1081 ctggccgatc ccaagttcgc tcaagtttctt caagaaatag gcttagecctc tctgggagcc
 1141 tcagatgaag acgttcagaa actggccacg tgctatttctt tcacaatcga gttccggctt
 1201 tgcaagcaag aaggctcaact gggggcgtac ggagcagggt tactttcctc catggagaa
 1261 ttgaagcatg ctcttctga caaggcgtgt gtaaaagcct ttgacccgaa gacaacctgc
 1321 ttgcaggaat gcctaattcac caccttccaa gatgcttact ttgtttctga aagttttgaa
 1381 gaagccaaag agaagatgag ggattttgca aagtcaattt cccgtccctt ctcagtat
 1441 ttcaacccctt acacacagag cattgaaattt ctgaaagaca ccagaagtat tgagaatgtg
 1501 gtgcaggacc tgccgactga ttgtacacc gtgtgcgcacg ccttgcataa aatgaaccaa
 1561 tatttgggaa ttgtacccctt ttgtcagcac gagotcttgg gggcttagca acaatgcagt
 1621 caatgttatac caacatcaac aactttctgt gtcacggctg gctagtaagc atgcaattcc
 1681 atgtgtctat acctctatgt aacttaacat acaaaaatga tctaaagaaac ccaggcagat
 1741 gaccattcag cattttaaag attgtatctt atttgaacat ctcagtttgcattt

1801 ctgatttagtg agcaaactgt aacttaagca aactgtgtct taaaaatttg tagccacat
1861 tcctcacaca attccagctg ctgagtcott gacctttct tccttggacc tgagtcttc
1921 ctctgtgttc attagataaa atgaaaacag ttgggaggtg gttctactt tcaatagtat
1981 tggtgttctc tgagataaac tagagttgct ccaagctcg catcacagta aaaaaagatt
2041 taatattttt cttcagaagc tggcagaaaa cacagcgatt ggaatgaatc tggactgagt
2101 gtttagacaa tgcaagaaaa gaaaaatttt gataaacagg atatatagat tgcactgacc
2161 ttgttgaaac caatttgtgg taogttctt gaagtgcctt tggaaaggaaa cactttgaca
2221 aagaatattt ggaaaggta aacagaaggg aagaaaatct tggactgtg aatgtgtcat
2281 tagaataaaag tgaattatca gtgcaggtgt gactcccttc tttcacactg agaaccddaa
2341 atcctgcagg gatgtgagta ccatdtctga ttccgaagat tggaaaccg agtcacagag
2401 aaacaaaggg atttgttca gtaggtctg tggctgggg gtgcagtcat aatcccccc
2461 cccctttatg ttggacttct ggcaagtcta ctgtatgtt catgcgggaa tatgtatgaa
2521 caaaaaaaga aaactaatgc gtataaaact aatgctctc aataaacaga aacttggccc
2581 c

SEQ ID No. 6: Aminosäuresequenz der neuronalen Tryptophanhydroxylase (nTPH) der Ratte (*Rattus norvegicus*)

MQPAMMMFSSKYWARRGLSLDAVPEEHQILGGLTQNKTAKS
EDKRSGKDTSESSKTAVVFSLKNEVGGLVRALRLFQEKHVNMLHIESRRSRRSSEVE
IFVDCECGKTEFNELIQLLKFOTTIVTLNPPDNIWTEEEELEDVPWFPRKISELDRC
HRVLMYGTTELADHPGFKDNVYRQRRKYFVDVAMGYKYQPIPRVEYETEETKTWGV
FREL SKLYPTHACREYLKNFPLLTKYCGYREDNVPQLEDVSMFLKERSGFTVRPVAGY
LSPRDFLAGLAYRVFHCTQYVRHSDPLYTPEPDTCHELLGHVPLLADPKFAQFSQEI
GLASLGASDEDVQKLATCYFFTIEFGLCKQEGQLRAYGAGLLSSIGELKHALSDKACV
KAFDPKTTCLQECLITTFQDAYFVSESFEEAKEKMRDFAKSITRPF SVYFNPYTQSIE
ILKDTRSIENVVQDLRSDLNTVCDALNKMNQYLG

ANSPRÜCHE

1. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit neuronaler Tryptophanhydroxylaseaktivität kodiert, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 5 (DNA-SEQUENZ MENSCH, MAUS, RATTE) dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 5 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
- c) Derivate der in SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 5 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für die Polypeptide mit der in SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 4 oder SEQ ID No: 6 (AMINOSÄURESEQUENZ MENSCH, MAUS, RATTE) kodieren und mindestens 80% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die biologische Aktivität der Polypeptide wesentlich reduziert ist,
- d) einer humanen genomischen Nukleinsäuresequenz, welche das Gen für sn-TPH enthält und Polymorphismen aufweist.

2. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz gem. Anspruch 1.

3. Aminosäuresequenz nach Anspruch 2, codiert durch die in SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 4 oder SEQ ID No: 6 dargestellte Sequenz.

4. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz, wobei die Nukleinsäuresequenz in Antisense oder Sense-Richtung mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.

5. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 4.

6. Rekombinanter prokaryontischer oder eukaryontischer Wirtsorganismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 4 oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 5.

7. Rekombinanter prokaryontischer oder eukaryontischer Wirtsorganismus nach Anspruch 6, wobei es sich bei dem Organismus um einen Mikroorganismus oder ein Tier handelt.

8. Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 2 oder von Peptidfragmenten davon als Antigen zur Erzeugung von spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörpern oder Antikörpergemischen gerichtet gegen Proteine gemäß Anspruch 2 oder 3.

9. Polyklonale oder monoklonale Antikörper oder Antikörpergemische, die spezifische Proteine nach Anspruch 2 oder 3 erkennen.

10. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1, eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls gemäß Anspruch 4 oder einer Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 2 oder 3 zur Identifizierung/Auffindung von Proteinen, die zu einem Protein, das durch die Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 2 codiert wird, spezifische Bindungsaaffinitäten aufweisen, oder zur Identifizierung von Nukleinsäuren, die für Proteine kodieren, die zu einer Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 2 oder 3 spezifische Bindungsaaffinitäten aufweisen.

11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Two-Hybrid-System verwendet wird.
12. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gem. Anspruch 1 oder eines Fragmentes davon zur Isolierung einer genomischen Sequenz über Homologiescreening.
13. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 als Marker für humane Erbkrankheiten.
14. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1, eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls gemäß Anspruch 4 oder eines Fragments von diesen zur Gentherapie.
15. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder eines Proteins nach Anspruch 2 oder 3 zur Beeinflussung des Serotoninspiegels durch spezifische Regulierung der sNTPH- Aktivität/-Menge.
16. Verwendung einer Sequenz nach Anspruch 1 oder eines Proteins nach Anspruch 2 oder 3 zur Diagnostik sowie zur Behandlung von neuronalen Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch Beeinflussung der sNTPH- Aktivität erhöht oder erniedrigt wird.
17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß eine spezifische Inhibierung der peripheren Serotoninbiosynthese durchgeführt wird, nachfolgend die aus dem CNS stammenden Metabolitenkonzentrationen bestimmt werden und anhand einer Vergleichskurve der Krankheitsgrad ermittelt wird.

18. Verfahren zur Behandlung neuronaler Erkrankungen nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch gewebsspezifische Überexpression von snTPH erhöht wird.

19. Verfahren zur Behandlung neuronaler Erkrankungen nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch Zugabe der Vorgängersubstanz 5-Hydroxytryptophan erhöht wird.

20. Verfahren zur Behandlung neuronaler Erkrankungen nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch Zugabe von substituierten Analoga von 5-Hydroxytryptophan erhöht wird.

21. Verwendung zur Behandlung neuronaler Erkrankungen nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch Ribozyme erniedrigt wird.

22. Verwendung zur Behandlung neuronaler Erkrankungen nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch Antisense-Oligonukleotide erniedrigt wird.

23. Verwendung zur Behandlung neuronaler Erkrankungen nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch Antisense-RNA-Expression erniedrigt wird.

24. Verwendung zur Behandlung neuronaler Erkrankungen nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion mit Hilfe spezifischer TPH-Inhibitoren wie p-Chlorphenylalanin oder p-Ethinylenphenylalanin erniedrigt wird.

25. Verwendung einer Sequenz nach Anspruch 1 oder eines Proteins nach Anspruch 2 oder 3 zur Behandlung von Störungen des

Schlafs, der Angst, des Alkoholkonsums, des Drogenkonsums, der Nahrungsaufnahme oder des sexuellen Verhaltens, dadurch gekennzeichnet, dass der Serotonininspiegel durch Modulation der Genexpression von sNTPH beeinflusst wird.

26. Kombinationspräparat, umfassend ein Protein nach Anspruch 2 oder 3 und mindestens ein weiteres Protein, insbesondere zur Regulation des Serotonin-Stoffwechsels.

27. Kombinationspräparat nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das weitere Protein eine periphere Tryptophanhydroxylase ist.

28. Kombinationspräparat nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die periphere und gleichzeitig die neuronale Serotoninproduktion erhöht oder erniedrigt wird.

29. Kombinationspräparat, nach Anspruch 26 zur Behandlung von Blutungsepisoden in der psychopharmakologischen Behandlung von Depressionen mit Antidepressiva, die auf den Serotonin-Wiederaufnahme-Transporter wirken, enthaltend Antidepressiva und von Willebrand-Faktor.

ABBILDUNGEN

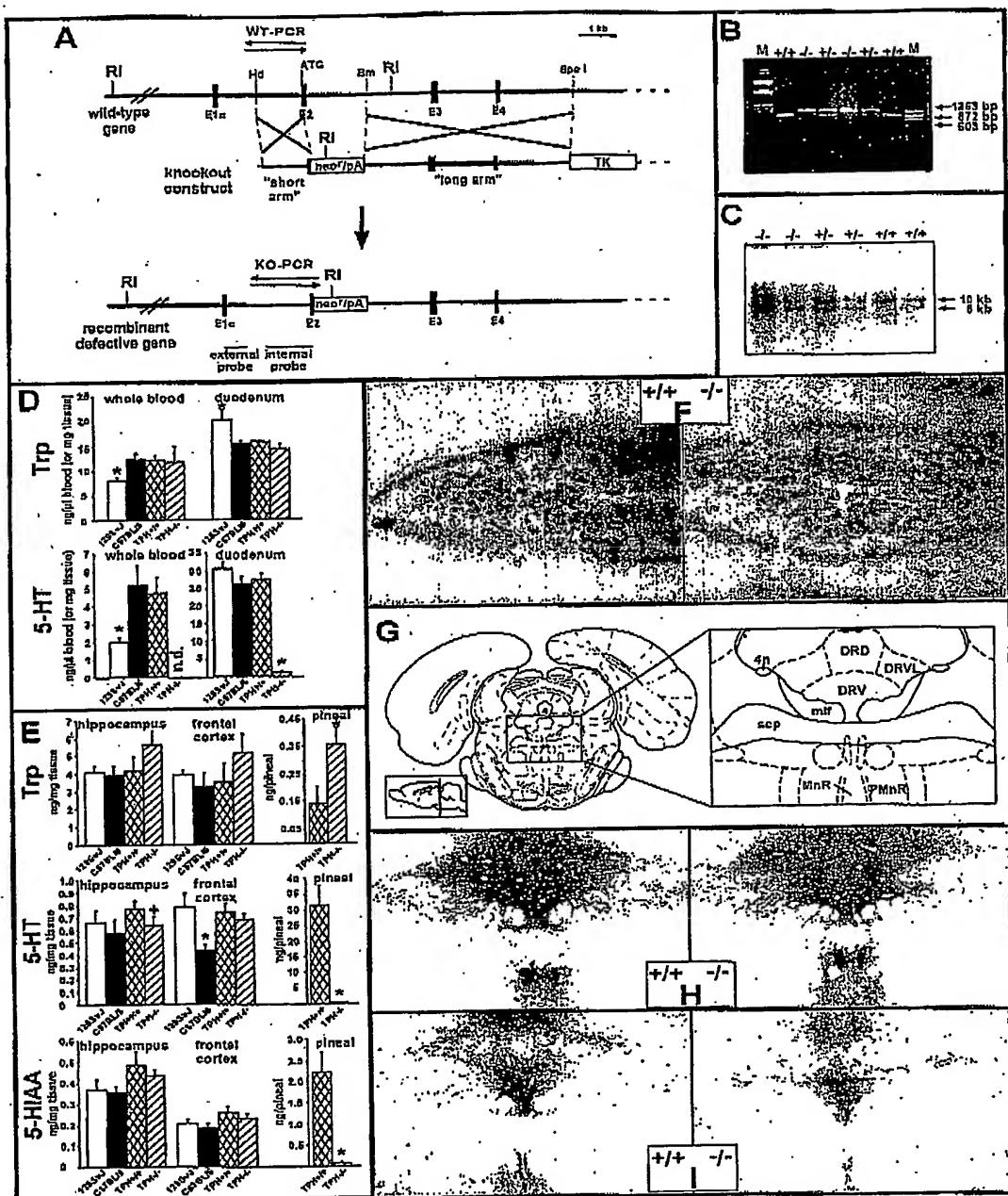


Abbildung 1

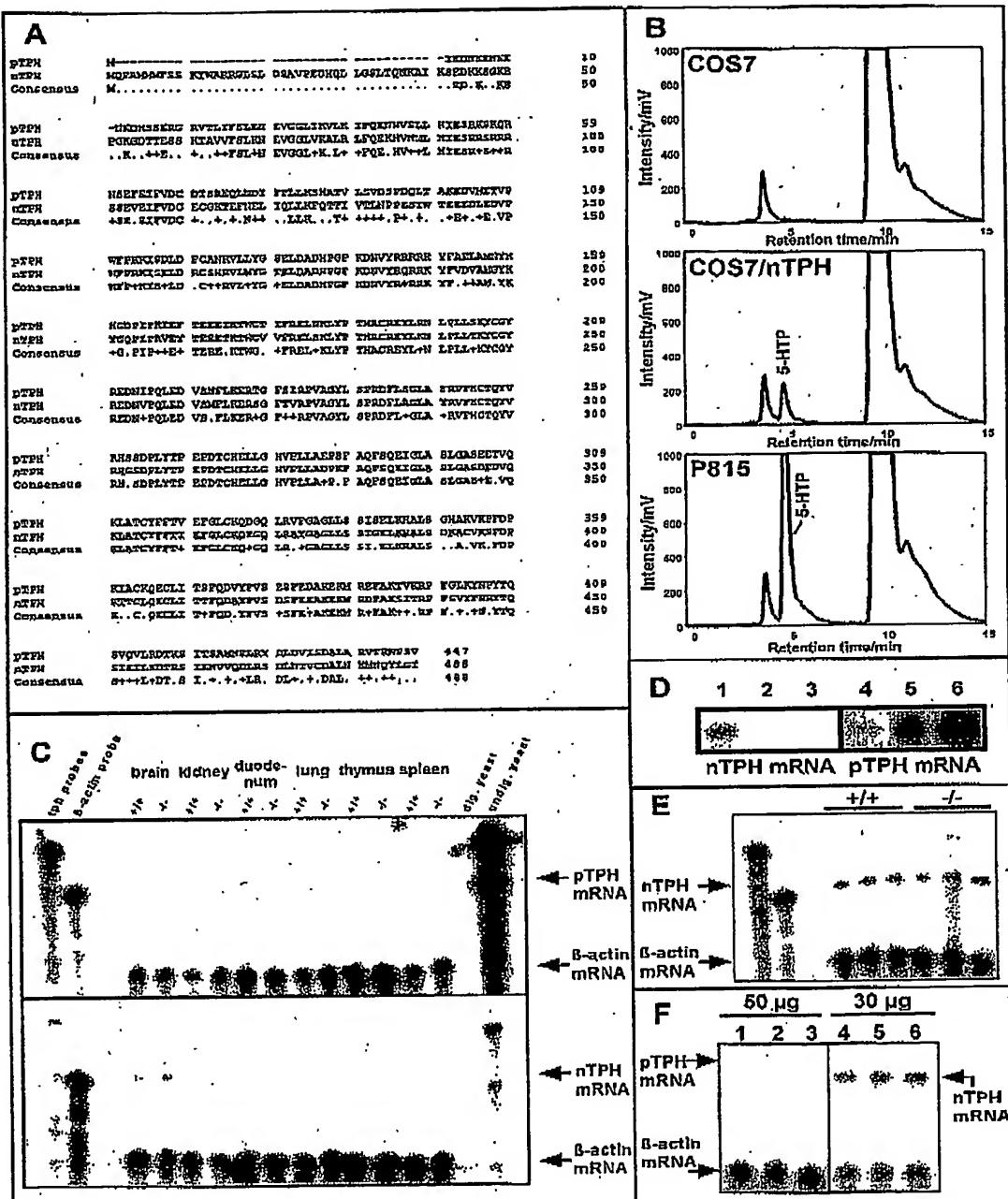


Abbildung 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.